

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-287584

(43) 公開日 平成10年(1998)10月27日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	F I	
A 6 1 K 35/84	A E D	A 6 1 K 35/84	A E D A
	A D U		A D U
A 2 3 L 1/28		A 2 3 L 1/28	Z
A 6 1 K 31/715		A 6 1 K 31/715	
C 1 2 P 19/04		C 1 2 P 19/04	B
審査請求 未請求 請求項の数3 O L (全 6 頁)			

(21) 出願番号 特願平9-89378

(22) 出願日 平成9年(1997)4月8日

(71) 出願人 595175301
株式会社応微研
山梨県東八代郡石和町井戸242
(71) 出願人 391060627
堀内 勲
山梨県東八代郡一宮町一ノ宮1014
(71) 出願人 595175312
須山 建
山梨県南都留郡忍野村内野442
(72) 発明者 堀内 勲
山梨県東八代郡一宮町一ノ宮1014
(74) 代理人 弁理士 浅川 哲

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生理活性物質及びその製造方法

(57) 【要約】

【課題】 アガリクスブラゼイの中に含まれるβ-グルカン等の活性多糖の収率向上を目的とする。

【解決手段】 アガリクスブラゼイの菌糸体、子実体又は菌糸体を培養した後の廃液のいずれかを、ヘミセルラーゼを主体とする酵素剤で分解処理することを特徴とするβ-グルカンを多量に含有する生理活性物質の製造方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アガリクスブラゼイの菌糸体、子実体又は菌糸体を培養した後の廃液のいずれかを、ヘミセルラーゼを主体とする酵素剤で分解処理することによって得られる β -グルカンが多量に含有する生理活性物質。

【請求項2】 アガリクスブラゼイの菌糸体、子実体又は菌糸体を培養した後の廃液のいずれかを、ヘミセルラーゼを主体とする酵素剤で分解処理することを特徴とする β -グルカンが多量に含有する生理活性物質の製造方法。

【請求項3】 前記ヘミセルラーゼを主体とする酵素剤は、トリコデルマ・ビリデ JAM4033、トリコデルマ・ハルジアナム JAM4031、アスペルギルス・タマリ JAM4007及びアスペルギルス・ニガー JAM4012のそれぞれから得られることを特徴とする請求項2記載の生理活性物質の製造方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【発明の属する技術分野】本発明は、アガリクスブラゼイの菌糸体や子実体などから得られる生理活性物質および、この生理活性物質を得るための製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】アガリクスブラゼイ (*Agaricus blazei*) は、ブラジル原産の担子菌類キノコで、ガンやその他の成人病に対して優れた効果のあることが知られている。近年、このキノコの人工培養方法も開発されているが、栽培方法が難しいため、需要の拡大に供給が追いついていないのが現状である。

【0003】一方、アガリクスブラゼイに関する医学的および栄養学的研究は比較的盛んであり、このキノコに含有される主要な有効成分は多糖の一種である β -グルカンであることが報告されている。この β -グルカンは、免疫賦活能力が高く、免疫細胞 (NK細胞等) を活性化してガン細胞を攻撃し、ガンを殺滅させることが知られている。 β -グルカンは、アガリクスブラゼイに限らず、シイタケ、マツタケ、マイタケ等のキノコ類でも知られ、シイタケから抽出したレンチナンやカワラタケから抽出したクレスチンは、既に抗ガン剤として製薬化されているが、現在までの幾つかの研究では、アガリクスブラゼイが最も抗ガン作用のあるキノコとされている。

【0004】従来、アガリクスブラゼイから β -グルカン等の有効多糖を抽出する方法が提案されているが (例えば、特開平1-67195号参照)、アガリクスブラゼイに含まれる β -グルカン等がきわめて少ないことから、所定量の抽出量を得るためには大量のアガリクスブラゼイを必要とするといった問題があった。また、酵素剤を利用してアガリクスブラゼイの菌体からエキス成分を抽出する方法として、特開平5-268905号が知られている。この方法は、アガリクスブラゼイの菌体に

エンド-1,4- β -グルカナーゼ、キシラナーゼおよびエンド-1,3- β -グルカナーゼを含有する酵素剤を作用させて、マツタケ様の風味を保持した抽出エキスを液を得るものである。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、上述したエキス成分の抽出方法では、 β -グルカナーゼを含む酵素剤を利用しているために、アガリクスブラゼイの菌体中に含まれる β -グルカンあるいは菌体処理の途中で得られた β -グルカンがさらに分解してセルビオースやグルコースができてしまうといった問題があった。

【0006】そこで、本発明は、アガリクスブラゼイの菌糸体や子実体、あるいは菌糸体を培養した後の廃液から β -グルカン等の有効多糖を多量に含む生理活性物質を得ることを目的としている。特に、ヘミセルラーゼを酵素剤として利用することでアガリクスブラゼイの構造糖であるヘミセルロースを分解して β -グルカンが多量に含む活性多糖を得、アガリクスブラゼイから β -グルカンの収率を向上させるものである。

【0007】

【課題を解決するための手段】即ち、本発明の請求項1に係る生理活性物質は、アガリクスブラゼイの菌糸体、子実体又は菌糸体を培養した後の廃液のいずれかを、ヘミセルラーゼを主体とする酵素剤で分解処理することによって得られる β -グルカンが多量に含有することを特徴としている。

【0008】また、本発明の請求項2に係る生理活性物質の製造方法は、アガリクスブラゼイの菌糸体、子実体又は菌糸体を培養した後の廃液を、ヘミセルラーゼを主体とする酵素剤で分解処理することを特徴とする。

【0009】本発明における生理活性物質は、 β -D-グルカン等の低分子の活性多糖を多量に含有するもので、それ以外にも核酸等の有効成分を含むものである。活性多糖の分子量は約200万〜50万程度であり、このように低分子化することで、体内での消化吸収が一段と高まり、免疫賦活効果を期待できることになる。アガリクスブラゼイの菌糸体は、液体培養および固体培養のいずれによっても得ることができる。また、アガリクスブラゼイの子実体にはもちろんのこと菌糸体を培養した後の廃液にも β -グルカンなどが含まれることから、これらから生理活性物質を得ることができる。

【0010】本発明に用いられる酵素剤の主体はヘミセルラーゼである。本発明のヘミセルラーゼは、トリコデルマ・ビリデ JAM4033、トリコデルマ・ハルジアナム JAM4031、アスペルギルス・タマリ JAM4007及びアスペルギルス・ニガー JAM4012のそれぞれを培養することによって得られた酵素群 (例えば、マンナーゼ、アラビノシダーゼ、キシロビアーゼなど) や、一般に市販されている酵素剤 (例えば、シグマ社製のヘミセルラーゼ) を利用することもでき

る。ヘミセルラーゼを単独で使用することもできるが、他にペクチナーゼを混合して使用することで酵素処理の段階的反應がスムーズに移行する。

【0011】菌糸体を酵素処理したときの β -グルカンの分解生成過程を図1の概念図で説明すると、菌糸体は、 β -グルカンのほか、キシランやマンナン、アラビナン等が結合して長鎖繊維を構成している。これにヘミセルラーゼ又はペクチナーゼを混合した酵素を作用させると、ヘミセルロースが段階的に加水分解して結合鎖が切れ、高分子多糖を経て活性多糖(β -D-グルカン)が得られる。

【0012】菌糸体に対する酵素剤の添加割合は0.01~0.5重量%、望ましくは0.1重量%前後である。また、酵素処理液のpHは、3.0~8.5、望ましくはpH4.5前後である。酵素処理の温度は25~60℃、望ましくは約45℃である。さらに、酵素処理時間は20~120分、望ましくは約60分程度である。

【0013】酵素処理による反應がある程度まで進行したら、処理液を加熱して酵素反應を止める。通常、80~100℃で約10分間加熱して酵素を失活させる。酵素反應の停止によって、アガリクスブラゼイ由来の β -グルカンを多量に含む活性多糖の原料が完成する。さらに、これを濃縮、乾燥することで本発明の生理活性物質を得る。乾燥法は凍結乾燥が望ましいが、有効成分が比較的熱にも強いことからスプレードライによる乾燥も可能である。本発明生理活性物質は、主成分である β -グルカンの他に α -グルカン、 β -ガラクトグルカン、タンパク質グルカン等を含む。

【0014】

【発明の実施の形態】以下に、上記アガリクスブラゼイから得られる菌糸体等の培養方法およびこれを酵素処理する場合の実施の形態を説明する。

【0015】アガリクスブラゼイの菌糸体は、固体培養または液体培養のいずれの方法でも得ることができ、またアガリクスブラゼイの子実体は、本発明者が既に特許出願している栽培方法などによって得ることができる(特願平7-324617号公報参照)。アガリクスブラゼイの菌糸体を固体培養によって得る方法としては、例えば、麦粒を主体とした固体培地、又はMYA(麦芽エキス2%、酵母エキス1%、寒天2%)培地を滅菌し、アガリクスブラゼイの種菌を無菌操作によって接種

し、25度で30日間培養することで菌糸体を得られる。

【0016】一方、アガリクスブラゼイの菌糸体を液体培養によって得る方法としては、例えばSMY培地を用いた方法がある。このSMY培地の組成例を表1に示す。液体培養は一般的な好気性菌の培養方法に準ずる。培養条件例を表2に通す。元菌はアガリクスブラゼイから分離した菌株を用いる。元菌はスラント又は冷凍保存しておく。保存株をスラント等に継代しておこした後、液体培養に移す。通常、500ミリリットルの三角コルベンに200ミリリットルの液体培地を入れ、25度で振盪培養した場合、2週間で培養が完了する。出来上がった菌糸は無数の球状になり、液体部分は完全に澄んでいる。必要な量に応じてスケールを変えていく。大型タンクでも培養可能である。

【0017】

【表1】アガリクスブラゼイ菌糸体のSMY培地の組成例

ブドウ糖	2%
麦芽エキス	2%
酵母エキス	2%
pH	6.5

【0018】

【表2】アガリクスブラゼイ菌糸体の培養条件の例
ジャーファーメンターの場合

培養温度	25度
通気量	1:1 (V/V)
培養期間	3週間

【0019】出来上がった菌糸体と培養液を分離し菌糸体を回収する。分離する方法としては、メッシュによる口過または遠心分離で行う。回収した菌糸体は粗く破碎する。破碎するのは次の工程の酵素反應を容易にするためである。

【0020】回収した菌糸体はヘミセルラーゼを主体とする酵素剤によって酵素処理を行なう。この発明における最も特徴的な工程であり、ヘミセルラーゼを単独で、もしくはヘミセルラーゼにペクチナーゼを混合して使用する。酵素反應条件は使用する酵素に最も適した条件が選ばれるが、その一例を表3に示す。反應時間は通常1時間程度である。

【0021】

【表3】

アガリクス菌糸体の酵素処理条件

使用酵素	ヘミセルラーゼ：ペクチナーゼ 2:1
pH	4.5
温度	45度
反応時間	1時間
酵素液濃度	0.1%
酵素液：菌糸体 (V:V)	2:1

【0022】ある程度まで反應が進行したら酵素反應を

止める。通常、摂氏70度まで昇温して酵素を失活させ

る。酵素反応の停止によって、アガリクスブラゼイ由来の活性多糖の原料が完成する。しかし、このままではヘミセルラーゼ以外の酵素反応が進んだり、他の微生物の汚染による腐敗の心配があるので、酵素処理後に濃縮、乾燥して試料を得た。乾燥法としては凍結乾燥が望ましい。しかし、有効成分が比較的熱にも強いことからスプレードライによる乾燥でも可能である。

【0023】次に、アガリクスブラゼイの子実体を酵素処理法について説明する。子実体も菌糸体の一種なので、基本的には上述した菌糸体の酵素処理法に準じ、特別な処理方法はない。子実体は生のものでも乾燥品でもよい。生の子実体は2倍量の水を加え、そのままミキサーで破碎してから酵素処理する。乾燥子実体は20倍量(W/W)の水で10分程度煎じた後ミキサーで破碎し、煎じ液と共に酵素処理する。酵素液は、終濃度で0.1%になるよう調整する。

【0024】次に、上記試料を用いて行った臨床例の結果を示す。

臨床例1

北海道の女性(20才)は子宮ガンと診断され、平成7

年7月24日の血液検査では血液成分(赤血球、血色素、ヘマトクリット、LYM等)の降下が見られた。その後、平成7年9月20日には白血球数の減少が見られ(4200から3400に減少)、更に平成7年11月13日には2900、平成8年1月初旬には白血球数が400まで落ち込み、MCVの上昇が見られた。そこで、その直後から本発明の生理活性物質を服用したところ、翌平成8年2月の血液検査では白血球数がほぼ正常値を示し、その後の検査でも正常値を維持している。白血球数の変化を図2に示す。

【0025】臨床例2

東京の女性(51才)は、平成8年2月27日の血液検査で中性脂肪とALTが平常値を越えていたが、その直後に本発明の生理活性物質を服用したところ約1か月後の3月28日には検査結果が大幅に改善され、さらに6月15日の検査ではほぼ正常値まで改善することができた。その結果を表4に示す。

【0026】

【表4】

検査項目	測定値			基準値
	H8.2/27	H8.3/28	H8.6/15	
中性脂肪	198	119	77	50~150 (ng/dl)
A L T	62	57	41	5~45 (IU/L)

【0027】臨床例3

山梨の男性(54才)は、平成5年7月1日の血液検査では総体的に悪い数値(例えば中性脂肪950、ヘモグロビンA1C9.5、血糖値233)を示していたが、平成8年5月から本発明の生理活性物質を服用したところ

平成8年7月5日の血液検査では既に改善され、更に平成8年12月17日の血液検査ではほぼ正常値まで改善した。その結果を表5に示す。

【0028】

【表5】

検査項目	測定値			基準値
	H5.7/1	H8.7/5	H8.12/17	
中性脂肪	950	505	175	50~150 (ng/dl)
ヘモグロビン A1C	9.5	9.1	7.4	4.3~5.8 (%)
血糖値	233	195	187	60~110 (mg/dl)

【0029】臨床例4

45才の女性は、肝臓ガンで平成9年1月3日より入院、抗ガン剤と併用して本発明の生理活性物質を服用したところ、抗ガン剤による副作用も減退し、抗ガン剤効果が顕著に現れた。抗ガン剤との併用も有効と思われる。

【0030】臨床例5

22才の女性は、子宮ガンと診断された。妊娠中にガン細胞が発見されたので、すぐに本発明の生理活性物質を投与した。約3か月後、母子ともに出産することができた。

【0031】臨床例6

20才の男性は脳腫瘍と診断され、言語に障害がみられる程重傷であったが、本発明の生理活性物質を投与したところ、4か月後の平成9年1月10日には退院できるまでに回復した。

【0032】臨床例7

その他、土佐清水病院では現在100例ほどを臨床試験中であるが、概して有効とみられる。詳細は6月頃発表される。

【0033】次にNK活性についての臨床例を説明する。白血球の中にはB細胞、T細胞、マクロファージと共に、NK細胞(Natural Killer cell)が存在する。このNK細胞はガン細胞を直接攻撃

することが知られている。この活性がNK活性である。NK活性は、試験管内でガン細胞を3時間で殺滅する割合(%)で示し、例えばNK活性が55とは、100個あったガン細胞のうち55個が3時間で殺滅されることを意味する。数値が大きいほどNK活性が高く、通常は健康人で55~75、ガン患者では20~40程度である。NK活性が55以上であれば、ガン細胞の増殖をNK細胞による攻撃が上回って、ガンが抑制あるいは縮小する可能性が高い。従って、NK活性は55以上を維持する必要があるが、現代社会における生活習慣では50を下回ることは珍しくない。

【0034】in vitro試験(試験管内試験)

A, B, C 3名の血液からNK細胞を分離し、試験管内で本発明の生理活性物質を作用させて16時間放置した後にNK活性を測定した。その結果を、NK細胞に本発明の生理活性物質を作用させないでNK活性を測定した場合との比較で図2に示した。なお、NK細胞濃度による影響を避けるために、NK細胞とガン細胞の濃度は3段階で試験し、平均値で示した。

【0035】in vivo試験(生体内試験)

D, E 2名に本発明の生理活性物質を1日当たり約50mg、1週間に亘って飲用させたのち、血液からNK細胞を採取してNK活性を測定した。NK活性の測定は、

上記と同様の方法で行った。その結果を、本発明の生理活性物質を飲用する前のNK活性の測定値と比較した場合を図3に示した。

【0036】

【発明の効果】以上説明したように、本発明に係る生理活性物質及びその製造方法によれば、アガリクスブラゼイの菌糸体、子実体又は菌糸体を培養した後の廃液のいずれかを、ヘミセルラーゼを主体とする酵素剤で分解処理することで、 β -グルカンを多量に含有する活性多糖の収率を上げることができた。また、活性多糖の濃度が高められることから、本発明の生理活性物質を体内に取り込んだときの消化吸収が飛躍的に向上し、また速効性もあってガンその他の成人病に対して優れた免疫賦活効果を発揮する。

【図面の簡単な説明】

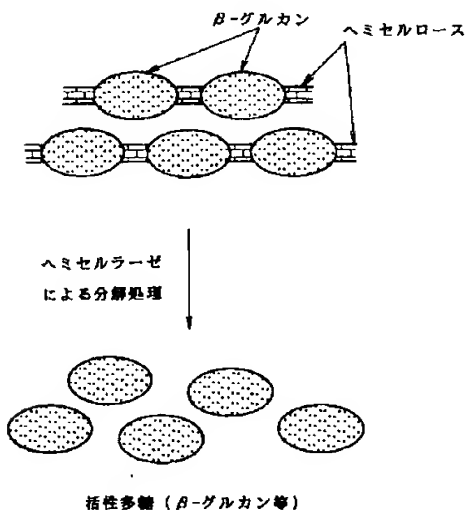
【図1】本発明に係る生理活性物質の分解生成過程を示す概念図である。

【図2】本発明における生理活性物質を使用した時の白血球の増加を示す図である。

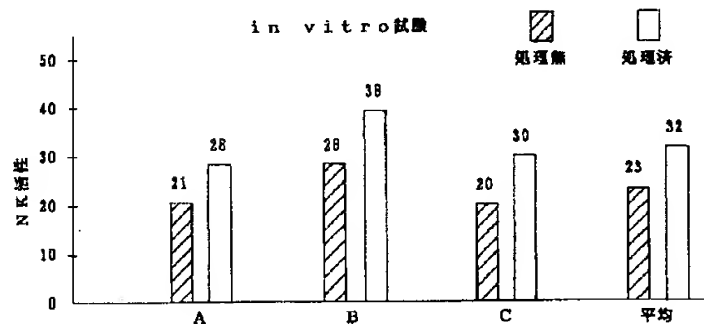
【図3】in vitro試験におけるNK活性の測定図である。

【図4】in vivo試験におけるNK活性の測定図である。

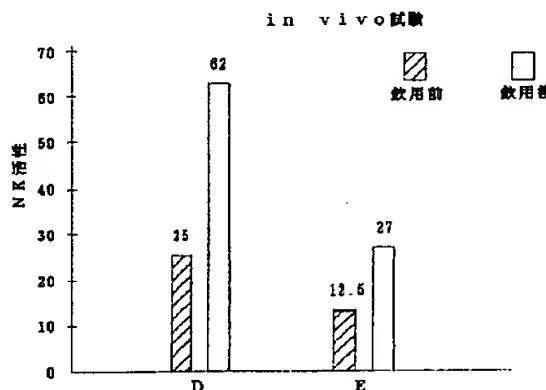
【図1】



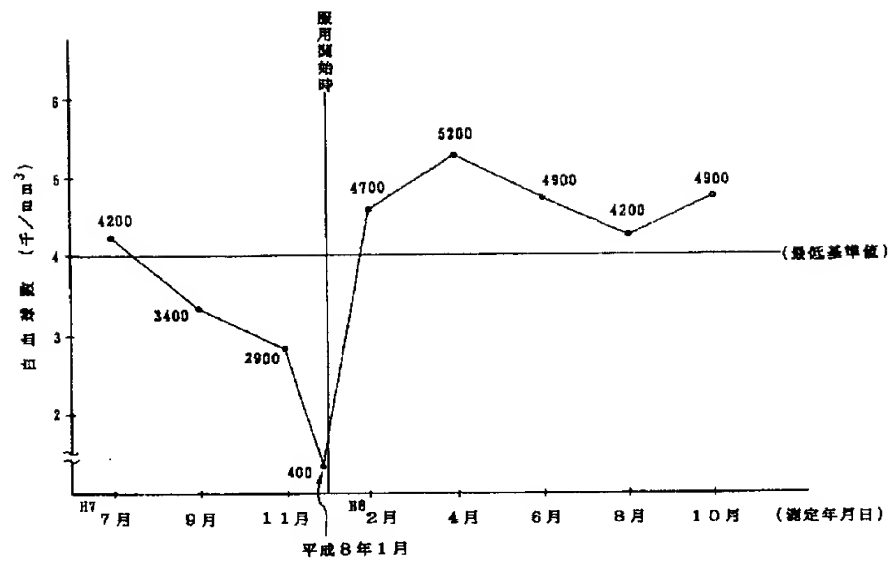
【図3】



【図4】



【図2】



フロントページの続き

(72)発明者 須山 建
山梨県南都留郡忍野村内野442

(72)発明者 森尾 恒久
東京都中央区京橋1-19-8 アサヒビ
ル薬品株式会社内

POWERED BY **Dialog**

PHYSIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCE AND ITS PRODUCTION

Publication Number: 10-287584 (JP 10287584 A) , October 27, 1998

Inventors:

HORIUCHI ISAO
SUYAMA KEN
MORIO TSUNEHISA

Applicants

OUBIKEN KK (A Japanese Company or Corporation), JP (Japan)
HORIUCHI ISAO (An Individual), JP (Japan)
SUYAMA KEN (An Individual), JP (Japan)

Application Number: 09-089378 (JP 9789378) , April 08, 1997

International Class (IPC Edition 6):

A61K-035/84
A61K-035/84
A23L-001/28
A61K-031/715
C12P-019/04

JAPIO Class:

14.4 (ORGANIC CHEMISTRY--- Medicine)
11.4 (AGRICULTURE--- Food Products)
14.5 (ORGANIC CHEMISTRY--- Microorganism Industry)

JAPIO Keywords:

R051 (PHARMACEUTICALS--- Anti-cancer Agents)
R059 (MACHINERY--- Freeze Drying)

Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To produce a physiologically active substance containing a large amount of a .gamma.-glucan by carrying out the hydrolytic treatment of a mycelium, a fruiting body, etc., of Agaricus blazei with especially a hemicellulase as an enzymic agent.

SOLUTION: This physiologically active substance is produced by carrying out the hydrolytic treatment of any of a mycelium or a fruiting body of Agaricus blazei or a waste liquor after culturing the mycelium thereof with an enzymic agent consisting essentially of a hemicellulase at 25-60 deg.C for 20-120 min. Active polysaccharides containing a large amount of a .gamma.-glucan are obtained to raise the yield of the .beta.-glucan from the Agaricus blazei. The hemicellulase is obtained by culturing Trichoderma viride JAM4033. Aspergillus tamarii JAM4007, etc. Since the concentration of the active polysaccharides is raised, the digestion and absorption are remarkably improved when incorporating the physiologically active substance into the body and the substance has rapid action properties and is capable of manifesting

excellent immunopotentiating effects on cancers and other adult diseases.

JAPIO

© 2002 Japan Patent Information Organization. All rights reserved.

Dialog® File Number 347 Accession Number 6004484